

12. La huella metabólica del cáncer

JOSÉ M. CUEZVA

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias desempeñan un papel esencial en la fisiología de la célula eucariótica. Son orgánulos dinámicos con la capacidad de cambiar su forma, tamaño y distribución subcelular (1), así como su actividad metabólica, en respuesta a diversas condiciones fisiológicas y patológicas (2-4). Las mitocondrias son entidades particulares a cada tipo celular de mamíferos que consideremos, pues tanto su número, como la estructura, composición molecular y la funcionalidad de las mismas es muy distinta dependiendo del tipo celular que se considere (5, 6). Otra característica única a estos orgánulos es que contienen su propio material genético (mtDNA) (4, 7, 8). El genoma mitocondrial se hereda de la madre y codifica para una fracción muy pequeña de los constituyentes moleculares de la mitocondria, pero que son esenciales para la actividad del orgánulo y la fisiología de la célula. Desde el punto de vista funcional, las mitocondrias están implicadas en gran cantidad de actividades metabólicas de la célula, siendo la provisión de energía por fosforilación oxidativa (9, 10) y la ejecución de la muerte celular (11-13) dos de las funciones del orgánulo que más trascendencia tienen para el desarrollo normal de la célula. Por esto, no es de extrañar que alteraciones genéticas y/o epigenéticas que afecten a cualquiera de estas dos actividades de la mitocondria estén involucradas en el desarrollo de un espectro muy amplio de patologías humanas (14, 15) que incluyen el envejecimiento fisiológico de los organismos (16, 17) y el cáncer (8, 18). Paradójicamente, aunque la relevancia de la mitocondria en la fisiología de la célula es incuestionable, en la actualidad desconocemos la mayoría de los mecanismos moleculares básicos que controlan la dotación y función de la mitocondria en los distintos tipos celulares de mamíferos

(3-5, 8, 19). En este contexto no resulta extraño que nuestro conocimiento de las alteraciones moleculares que promueven la expresión de un fenotipo mitocondrial aberrante en las distintas neoplasias y/o de la participación de la mitocondria en la progresión tumoral sea todavía mucho más escaso. En esta contribución resumiré algunas de las alteraciones fenotípicas que afectan al metabolismo energético en distintas neoplasias humanas y discutiré la posible aplicación de estos resultados para el diagnóstico, la prognosis y eventual diseño de nuevas estrategias terapéuticas de los pacientes oncológicos. Otros aspectos directamente relacionados con los mecanismos que regulan la biogénesis mitocondrial en células de mamífero y la participación de la mitocondria en la provisión de energía metabólica, así como en la ejecución de la muerte celular han sido revisados recientemente (7, 8).

WARBURG, PASTEUR Y EL FENOTIPO BIOENERGÉTICO DEL HÍGADO EN DESARROLLO

Una de las primeras observaciones que se realizó en el ámbito del cáncer es que la célula tumoral en condiciones de aerobiosis tiene una tasa glucolítica anormalmente alta (20, 21). En base a esta observación Otto Warburg propuso, a principios del siglo pasado y teniendo en consideración el principio de regulación metabólica que conocemos como efecto Pasteur, la hipótesis de que la mitocondria de la célula tumoral tenía que tener su función bioenergética alterada. Desgraciadamente, la hipótesis de Warburg ha sido ignorada por la comunidad científica durante muchos años y en el mejor de los casos considerada un epifenómeno de la transformación oncológica (22). Recientemente, al haberse demostrado molecular y funcionalmente que la mayoría de los tumores humanos presentan un fenotipo glucolítico incrementado cuando se compara con el fenotipo de la célula normal de la que proceden (23-27), la comunidad científica y el tejido empresarial han despertado un cierto interés por este tema (22). Posiblemente, porque se ha puesto de manifiesto la posible utilidad de estos marcadores para la prognosis de pacientes oncológicos (25, 26, 28) y eventualmente, como posibles dianas terapéuticas del cáncer (22, 29).

El efecto Pasteur básicamente predice que el flujo metabólico de la glucólisis en células aerobias, evaluado por aumento del consumo de glu-

cosa y/o por aumento de la producción de lactato, depende de la energía metabólica que aporta la fosforilación oxidativa mitocondrial en forma de ATP (Fig. 1). Si por cualquier razón se produce una limitación en el aporte de energía metabólica por parte de la mitocondria, ya sea por una limitación en la disponibilidad de oxígeno a la célula o porque dicha célula presenta una alteración genética y/o epigenética que afecta el funcionamiento normal de la fosforilación oxidativa, el flujo de la glucólisis debe incrementarse con objeto de aportar el ATP necesario para hacer frente a la demanda energética celular. En determinadas circunstancias, y dependiendo de la duración y tipo de insulto celular que se produzca, así como del tipo celular que se considere, el aumento del flujo glucolítico mediante regulación alostérica de algunos de los enzimas clave de la vía glucolítica (Fig. 1) puede compensar el déficit energético que se produzca. Sin

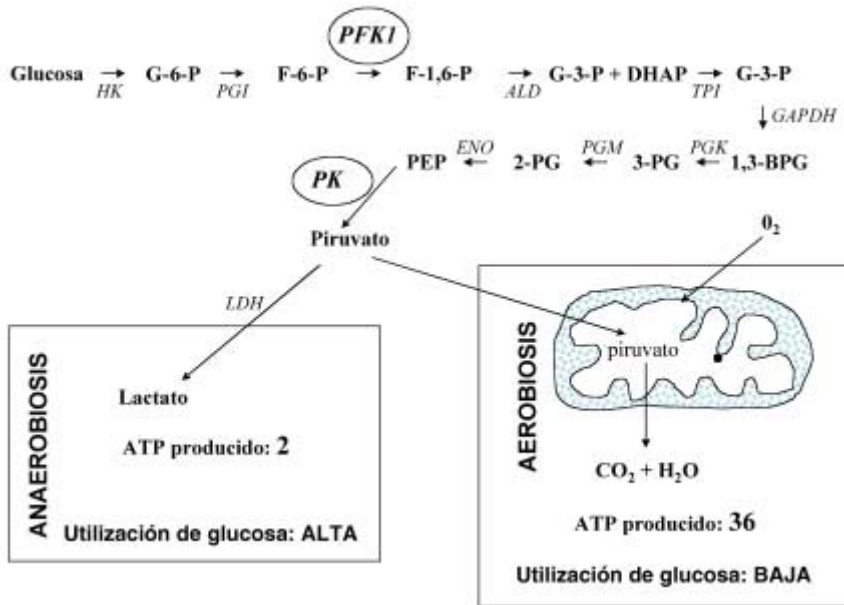


FIGURA 1. *Efecto Pasteur*: La producción mitocondrial de ATP por fosforilación oxidativa define el consumo de glucosa de la célula. Se presentan los intermediarios metabólicos (en **negrita**) y enzimas (en *cursiva*) de vía glucolítica hasta la encrucijada del piruvato. Los enzimas alostéricos fosfofructoquinasa 1 (PFK1) y piruvatoquinasa (PK), reguladores del flujo glucolítico, se muestran dentro de elipses. La reducción del piruvato a lactato en anaerobiosis y/o cuando la función productora de energía de la mitocondria se encuentra afectada, promueve un mayor consumo de glucosa por la célula. En presencia de oxígeno y/o cuando la función productora de energía de la mitocondria es normal, el piruvato es oxidado a anhídrido carbónico y agua con gran rendimiento energético, lo que promueve un menor consumo de glucosa por la célula.

embargo, si este ajuste metabólico, regulado a corto plazo, es insuficiente para suministrar la energía metabólica que la actividad celular demanda, es de prever que el fenotipo bioenergético de la célula se tendrá que ajustar a un nuevo estado estacionario en la expresión de los enzimas involucrados en las vías de producción de energía.

Un ejemplo muy bello de la operatividad a corto y largo plazo en condiciones fisiológicas del efecto Pasteur es el que aporta el cambio en la preponderancia en las vías de producción de energía metabólica, glucolisis *versus* fosforilación oxidativa, que se produce en el hígado de mamíferos durante el desarrollo, en concreto durante la transición fetal-neonatal (2, 30). En efecto, durante el desarrollo fetal los hepatocitos obtienen la mayor parte de su energía metabólica por vía glucolítica, siendo grandes consumidores de glucosa y productores de lactato —para revisión del tema ver (2)—, porque sus mitocondrias no están diferenciadas y por tanto carecen de la actividad funcional necesaria para realizar el aporte energético por fosforilación oxidativa (31). Sin embargo, inmediatamente después del nacimiento, se produce la diferenciación mitocondrial con el establecimiento, en un espacio de tiempo muy pequeño (primera hora de vida), de una eficiente fosforilación oxidativa (31-34). Este cambio brusco, regulado a muy corto plazo, posiblemente por el aumento en la disponibilidad de oxígeno que experimenta el neonato tras el nacimiento, se expresa a nivel metabólico por una drástica disminución del consumo de glucosa y de la producción de lactato por parte del hepatocito neonatal (34). A largo plazo, en cuestión de días-semanas y durante el período que consideramos del desarrollo neonatal, la capacidad mitocondrial de la célula hepática se verá fuertemente incrementada porque además se instaura en ella el proceso de proliferación mitocondrial (2, 35-37) que contribuye de forma significativa al aumento del número de orgánulos por célula. Este cambio en la relevancia relativa de la glucolisis frente a la fosforilación oxidativa que nos aporta el desarrollo en la célula hepática está lógicamente asociado a un cambio paulatino en la expresión de los marcadores metabólicos que definen ambas vías metabólicas. Así, mientras las actividades de las enzimas glucolíticas en el hígado fetal son 3-4 veces mayores que en el hígado adulto, la expresión de marcadores mitocondriales en el hígado adulto son 4-5 veces más elevados que durante la etapa fetal (2, 8). En resumen, la adaptación metabólica que experimenta la célula hepática durante el desarrollo en cuanto a las vías de producción de energía se

refiere tiene una manifestación fenotípica evidente en la expresión relativa de marcadores proteicos de ambas vías estando éstas inversamente relacionadas.

PASTEUR Y EL FENOTIPO BIOENERGÉTICO DE LA CÉLULA CON PATOLOGÍA MITOCONDRIAL

Otro ejemplo de la relación inversa que existe entre glucolisis y fosforilación oxidativa lo aportan las patologías mitocondriales que resultan de mutaciones muy diversas sobre el material genético que está implicado en la función transductora de energía metabólica de la mitocondria (14, 15). En estas patologías se observa que las células afectadas compensan el déficit energético que la alteración mitocondrial impone mediante un aumento del flujo de la glucolisis (38, 39). En estas situaciones, el aumento de la glucolisis está asociado a un aumento en la expresión de genes de la vía glucolítica (38, 39). En su conjunto, lo que nos sugiere la adaptación metabólica del hígado en desarrollo, así como las patologías mitocondriales asociadas a mutaciones en el DNA mitocondrial, es que para que se produzca la expresión de un fenotipo glucolítico aberrante no es necesario que se produzcan mutaciones en los genes que regulan la expresión de los genes glucolíticos, ya que éste se puede producir mediante el control que el estado energético celular ejerce sobre las dos vías de producción de energía metabólica de la célula.

MUTACIONES EN GENES DE LA FUNCIÓN BIOENERGÉTICA DE LA MITOCONDRIA Y CÁNCER

El DNA mitocondrial (mtDNA) es fisiológicamente más vulnerable a la modificación química que el DNA nuclear (nDNA). Por ejemplo, se ha estimado que los radicales de oxígeno producen un orden de magnitud más de mutaciones en el mtDNA que en el nDNA (40). La mayor vulnerabilidad a mutaciones del mtDNA inducidas por estrés oxidativo puede ser la consecuencia de múltiples factores: (i) su mayor proximidad física al sitio donde se producen la mayoría de las especies reactivas de oxígeno en la célula, que no es otro que la cadena de transporte de

electrones; (ii) su naturaleza desnuda pues, contrariamente al nDNA, no está protegido por histonas y otras proteínas; (iii) la ausencia de un sistema de reparación de DNA eficiente en la mitocondria, y (iv) que el mtDNA es una molécula 93% codificante mientras que el nDNA sólo es codificante en un 3%, de tal manera que las mutaciones en mtDNA previsiblemente afectarán a los productos de sus genes con más facilidad y tendrán la consiguiente manifestación fenotípica. Así, se han descrito más de cien mutaciones en el mtDNA de la línea germinal asociadas con varios tipos de enfermedades humanas (14, 15).

Más recientemente, se han descrito muchas mutaciones somáticas en el mtDNA de muchos tipos de tumores humanos, incluyendo mama, ovario, colon, hígado, estómago, esófago, cabeza y cuello, tiroides y próstata —(41) para revisión ver (42)—. Las mutaciones somáticas descritas incluyen delecciones, inserciones y mutaciones puntuales y afectan, principalmente, a una pequeña región no-codificante del mtDNA, que es necesaria para la correcta replicación y transcripción del mismo y que se conoce como el D-loop (4). En algunos tipos de tumores, como es el caso de mama, las mutaciones del mtDNA afectan al 80% de los tumores analizados (43, 44). Una diferencia importante entre las mutaciones descritas en el mtDNA que afectan a las enfermedades mitocondriales clásicas y las descritas en cáncer es que en este último caso suelen ser fundamentalmente homoplásmicas, esto es, afectan a la práctica totalidad de las moléculas de mtDNA presente en la célula tumoral (8). No está claro cómo en cáncer se alcanza el grado de homoplasmia para las mutaciones del mtDNA. Es posible que estas moléculas tengan alguna ventaja replicativa sobre las no mutadas y que la naturaleza clonal de las células tumorales contribuya a su expansión preferencial (45). Además, también se han descrito mutaciones en el genoma nuclear de genes cuyos productos están implicados en la función de transducción de energía metabólica de la célula. Así, mutaciones en los genes de la fumarasa y de la succinato deshidrogenasa están asociadas con el desarrollo de paragangliomas, feocromocitomas y tumores gástricos y de colon (40, 46, 47). En líneas generales, parece que el cáncer está asociado de alguna manera con la existencia de mutaciones en los dos genomas que codifican los componentes implicados en la función bioenergética de la mitocondria, quedando pendiente de demostración el hecho de si estas mutaciones son una causa o una consecuencia del cáncer, así como la implicación de las mismas en la progresión tumoral.

En este último sentido, la implantación de células ρ^0 (carentes de mtDNA) en ratones inmunosuprimidos, con objeto de verificar la relevancia del mtDNA en la progresión del cáncer, ha dado resultados contradictorios. Para unos autores (48) las células ρ^0 tienen un mayor potencial de formación de tumores, mientras que para otros (49) su potencial es menor cuando se comparan con las células originales con su mtDNA intacto. Estudios más recientes, empleando células con mutaciones definidas en el mtDNA, parecen indicar que la contribución de éstas a la progresión tumoral estriba en: (i) un exceso de generación de radicales libres de oxígeno, con el consiguiente aumento de la señalización de vías de supervivencia celular (50); (ii) una disminución del potencial apoptótico de la célula (51), y (iii) la promoción de un fenotipo celular más invasivo al promoverse la expresión de marcadores tumorales específicos y de proteínas con efectos anti-apoptóticos (52, 53). En su conjunto, esta serie de resultados sugieren que una función mitocondrial alterada por la existencia de mutaciones en cualquiera de los dos genomas que codifican sus componentes moleculares está, de alguna manera aún no claramente establecida, relacionada con la progresión del cáncer y con la expresión de un fenotipo metabólico alterado en la célula tumoral.

WARBURG, PASTEUR Y EL FENOTIPO BIOENERGÉTICO DEL CÁNCER

Recientemente, basándonos en la hipótesis de Warburg (20, 21) y en los paradigmas anteriormente descritos, decidimos explorar con una aproximación inmunológica sencilla la posible existencia de una alteración de la función bioenergética de la mitocondria en cáncer, mediante el análisis de marcadores del proteoma mitocondrial, con objeto de verificar la hipótesis de Warburg y aportar una explicación metabólica al fenotipo glucolítico que caracteriza a las células tumorales (Fig. 2). Con este propósito estudiamos en biopsias normales y tumorales derivadas de los mismos pacientes oncológicos, la expresión de una proteína que es el cuello de botella de la fosforilación oxidativa mitocondrial (25-27). Nuestro razonamiento era que si el fenotipo bioenergético de la célula tumoral está alterado en cáncer, éste se tiene que manifestar en la muestra tumoral del paciente por una disminución en la expresión de

la subunidad catalítica β de la H^+ -ATP sintasa (β -F1-ATPasa), ya que esta proteína es un componente esencial para la síntesis mitocondrial de ATP (9) y su expresión está muy regulada por el estado energético celular (54). Decidimos combinar con el estudio de β -F1-ATPasa otro marcador de la capacidad mitocondrial en la célula, como es la proteína Hsp60. La proteína Hsp60 es un componente estructural del orgánulo (55) que está implicado en la biogénesis de la mayoría de las proteínas mitocondriales (56) (Fig. 2). Por tanto, cambios en la expresión de Hsp60 pueden aportar información de cómo la carcinogénesis está afectando la biogénesis mitocondrial en el tejido en cuestión (25-27), además de suministrar un valor de referencia de proteína mitocondrial para normalizar la expresión de β -F1-ATPasa (Fig. 2). Es decir, el cociente de la expresión β -F1-ATPasa/Hsp60 es un índice proteómico de la competencia bioenergética de la mitocondria en ese tejido y su posible alteración en cáncer un indicador de afectación mitocondrial por la neoplasia (8).

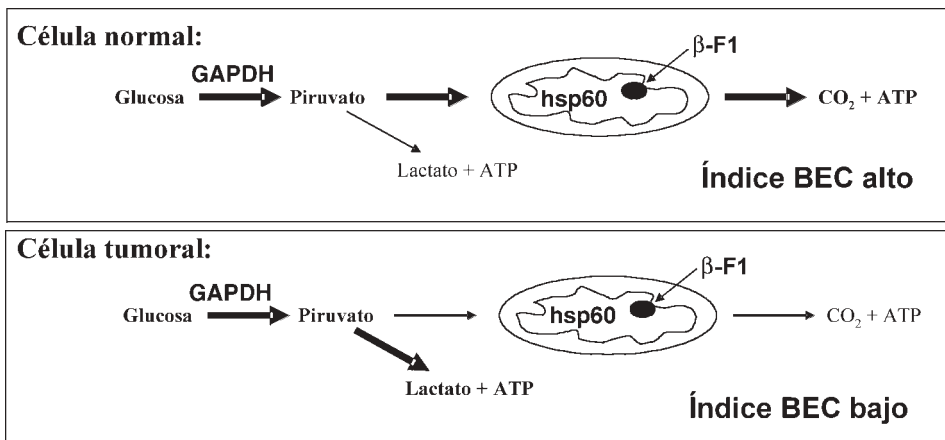


FIGURA 2. Análisis proteómico de la huella metabólica del cáncer. Se esquematiza el metabolismo de la glucosa en células normales y tumorales. El grosor de las flechas indica el flujo metabólico preferencial en cada situación según la hipótesis de Warburg. Se analiza la expresión de los siguientes marcadores: β -F1, subunidad β de la H^+ -ATP sintasa de la mitocondria; Hsp60, chaperonina mitocondrial 60 kDa y GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la vía glucolítica. Alteraciones del proteoma mitocondrial por el cáncer se pueden manifestar en variaciones del cociente β -F1/Hsp60, lo que sugiere una alteración de la competencia bioenergética del orgánulo en esa situación. La actividad mitocondrial global de la célula se expresa por el índice BEC, que es el cociente resultante de normalizar la razón β -F1/Hsp60 por la expresión del marcador glucolítico GAPDH (razón β -F1/Hsp60/GAPDH). Alteraciones de la función mitocondrial con el consiguiente aumento de la glucólisis en la célula tumoral producirán variaciones muy significativas en el índice BEC entre el tejido normal y el tumoral.

Sin embargo, la actividad mitocondrial en la célula, y en concreto de la fosforilación oxidativa, también depende del número de orgánulos que está contenga (2, 8). Con objeto de normalizar la expresión mitocondrial de β -F1-ATPasa (razón β -F1-ATPasa/Hsp60) respecto de la proteína celular decidimos utilizar como marcador celular la expresión de la proteína glucolítica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Fig. 2). Esta enzima, de acuerdo con el principio de Pasteur y dependiendo de la relevancia de la fosforilación oxidativa a la contribución energética de la célula, es previsible que tenga su expresión aumentada en aquellos tejidos donde se produzca una alteración de la funcionalidad mitocondrial, de tal forma que el valor del cociente de la expresión de los tres marcadores seleccionados (β -F1-ATPasa/Hsp60/GAPDH) aporta un índice bioenergético celular (índice BEC) que puede ser un marcador proteómico de las posibles alteraciones en la relevancia de la fosforilación oxidativa respecto de la glucólisis en distintas condiciones patofisiológicas (25-27). Así, se previó que alteraciones en la funcionalidad mitocondrial en cáncer supondrían disminuciones de la razón β -F1-ATPasa/Hsp60 que podrían verse magnificadas mediante una disminución aún mayor del índice BEC en aquellos tejidos donde se produjese de forma reactiva a la disminución del aporte energético la inducción de la glucólisis (Fig. 2).

La Figura 3 resume los datos del análisis de la expresión de los marcadores del índice BEC en diversos tipos de carcinomas de forma comparativa con la expresión de estos marcadores en los mismos tejidos no neoplásicos. En líneas generales, la expresión de la subunidad β de la H^+ -ATP sintasa está significativamente disminuida en carcinomas humanos de hígado, riñón, colon, mama, pulmón, esófago y estómago cuando se compara con su nivel de expresión en el tejido histológicamente sano del mismo paciente (25-27). Esta reducción en la expresión de β -F1-ATPasa en el tejido tumoral es aún mayor cuando se normaliza su expresión respecto de la proteína mitocondrial Hsp60 en muchos de estos tejidos, lo que se manifiesta por una reducción de la razón β -F1-ATPasa/Hsp60 (Fig. 3), indicando que una característica común a muchos tipos de células cancerosas es la alteración del proteoma mitocondrial (25-27,57). Recientemente, nuestros resultados han sido confirmados en tumores de riñón y de hígado (58-61) y extendidos a otros tipos de tumores (62). Curiosamente, y con los marcadores metabólicos empleados, no detectamos alteraciones del proteoma mitocondrial en

carcinomas de próstata (Fig. 3), posiblemente por las peculiaridades metabólicas de esta glándula (63). En líneas generales estos resultados sugieren que la función productora de energía de la mitocondria se puede ver afectada en la gran mayoría de los carcinomas humanos analizados. En efecto, en muchos de estos carcinomas (Fig. 3) observamos la inducción simultanea de uno o más de uno de los marcadores de la vía glucolítica que hemos estudiado, lo que conduce a variaciones aún mayores del índice BEC entre el tejido normal y el tumoral (25-27). Esta inducción de marcadores glucolíticos en el tejido tumoral es lo que hoy se ha venido en denominar efecto Warburg. Debemos resaltar como la determinación de la expresión de estos marcadores en las biopsias de tejido puede realizarse por técnicas inmunológicas muy diversas como la inmunohistoquímica (25) y «western blot» (27), así como por técnicas proteómicas de geles bidimensionales acopladas a la identificación de los marcadores por técnicas de espectrometría de masas (26) aportando los mismos resultados por cualesquiera de las técnicas que se empleen.

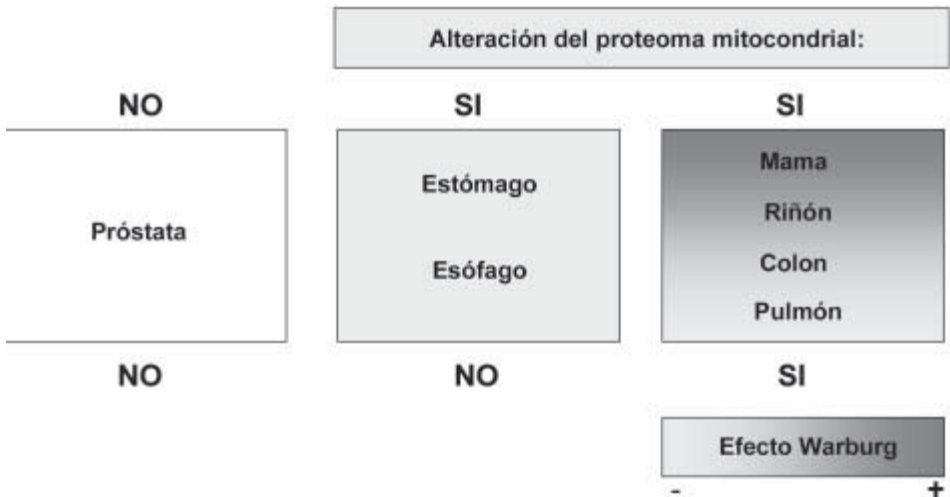


FIGURA. 3. Fenotipo bioenergético de tumores humanos. En los rectángulos se identifican los distintos tipos de carcinomas analizados. En la parte superior de los mismos se indica si se ha observado o no alteración del proteoma mitocondrial por disminución de la razón β -F1-ATPasa/Hsp60 en el carcinoma respecto del tejido normal. En la parte inferior de los rectángulos se indica si se ha observado o no alteración del proteoma glucolítico por aumento de la expresión de GAPDH (efecto Warburg) y/o de otro marcador de esta vía. La mayor intensidad del efecto Warburg en los carcinomas se indica por aumento de la intensidad del gris del sombreado del rectángulo.

UTILIDAD DE LOS MARCADORES DEL ÍNDICE BIOENERGÉTICO EN ONCOLOGÍA

El desarrollo a gran escala de técnicas genómicas (64-67) y proteómicas (28, 68-71) está permitiendo el análisis de la expresión de genes y proteínas que están asociadas con el fenotipo de un tipo particular de tumor, suministrando de esta manera lo que ha venido en denominarse la «firma o huella del tumor». El propósito de estos estudios es encontrar los marcadores moleculares que puedan ayudar en el diagnóstico precoz del cáncer y permitan predecir la prognosis de los pacientes. Lógicamente, con estas aproximaciones también se pretende descubrir nuevas «dianas moleculares» del tratamiento del cáncer para que puedan ser utilizadas en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En su conjunto, los resultados hasta aquí mostrados han puesto de manifiesto la existencia de un denominador común a muchos tipos de tumores, lo que hemos venido en denominar «la huella bioenergética del cáncer», que no es otro que la alteración del fenotipo metabólico de la célula tumoral. La identificación de un denominador común a muchos tipos de tumores nos hizo pensar en la posible utilidad clínica de los marcadores utilizados (25, 26). En este sentido, pensamos que aportarían una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico y la prognosis de pacientes oncológicos y, eventualmente, para el diseño de nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer. En efecto, debemos resaltar como el estudio de la expresión de la subunidad β -F1-ATPasa de la H^+ -ATP sintasa, del cociente β -F1/hsp60 y del índice BEC, en una muestra de 104 pacientes con adenocarcinomas de colon tienen valor como marcadores de la supervivencia global y libre de enfermedad en este tipo de pacientes oncológicos (25). Más recientemente, y utilizando una muestra de 90 tumores de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, hemos demostrado la gran sensibilidad ($> 97\%$) de estos marcadores para el diagnóstico de esta neoplasia (26). Es más, el índice BEC de los carcinomas de pulmón permite discriminar entre los carcinomas del mismo estadio clínico y del mismo tamaño aquellos que pronostican una supervivencia global más comprometida para los pacientes (26).

Recientemente, se ha demostrado en animales de experimentación que la utilización de inhibidores de las vías de producción de energía de la célula es una estrategia válida para atajar la progresión del cáncer. En

efecto, se ha observado que el tratamiento con Br-piruvato produce la regresión total de hepatocarcinomas de estado muy avanzado en la totalidad de los animales estudiados (72, 73). Por otro lado, se ha demos-

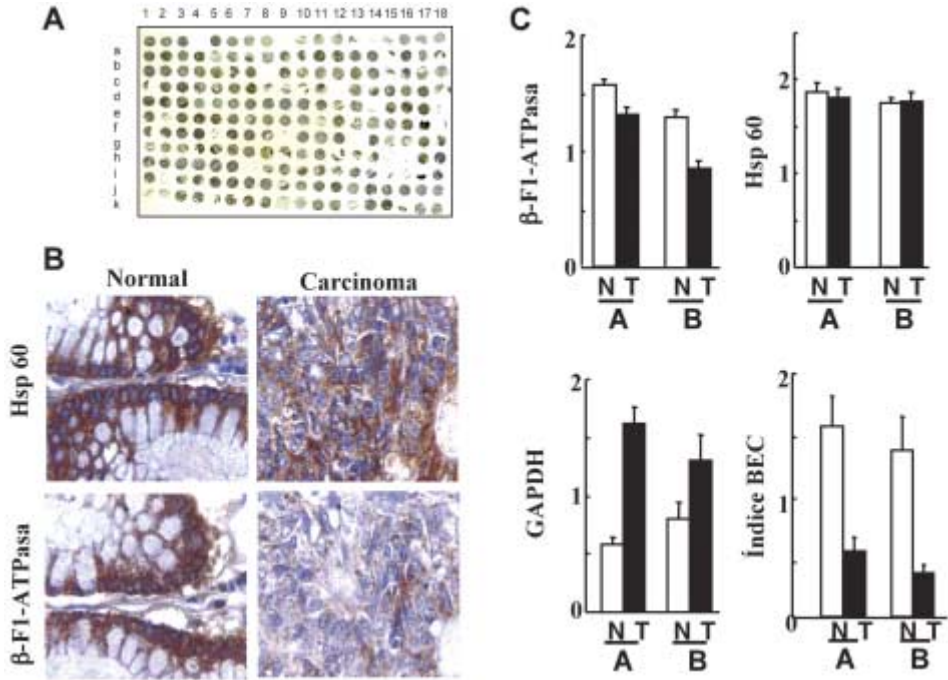


FIGURA. 4. Análisis por inmunohistoquímica de la huella mitocondrial del cáncer de colon. A) Ejemplo de un «array de tejido» de tumores de colon (estadio II, AJCC) que contiene 4-5 biopsias de un mismo paciente cuyas coordenadas en el array se identifican mediante letras y números. Se analizaron muestras de 104 pacientes con una historia clínica detallada. Los arrays se procesaron por inmunohistoquímica para cada uno de los marcadores del índice BEC y posteriormente se procedió a la cuantificación de la señal obtenida. B) Ejemplos representativos del inmunomarcaje en biopsia normal y del carcinoma con los anticuerpos contra los dos marcadores mitocondriales del índice BEC. Se aprecia la pérdida de señal del marcador β -F1-ATPasa en el tejido tumoral en ausencia de cambios significativos en la expresión de Hsp60 cuando se compara con el tejido sano. C) Expresión de los marcadores β -F1-ATPasa, Hsp60 y GAPDH, así como el valor del índice BEC (unidades arbitrarias) en muestras normales (N) y de tumor (T) de cáncer de colon. Los grupos A y B definen pacientes sin y con enfermedad progresiva, respectivamente. Se aprecia la disminución significativa de la expresión de β -F1-ATPasa en ausencia de cambios significativos en la expresión de Hsp60 en el tejido tumoral, así como la inducción de GAPDH en esta circunstancia. Como resultado, el índice BEC disminuye significativamente entre tejido normal y tumoral en ambos grupos de pacientes. Estos resultados están tomados de la referencia (25).

trado que la disminución de la expresión de la H^+ -ATP sintasa en células de cáncer de colon es una de las causas que confiere a este tipo celular su resistencia a la quimioterapia con 5-fluorouracilo (29). Es decir, proponemos que la caracterización del fenotipo metabólico del cáncer o «huella bioenergética del tumor» puede aportar una herramienta de gran valor en la práctica clínica para establecer el pronóstico y/o las futuras pautas terapéuticas de diversos tipos de pacientes oncológicos, ya que aporta marcadores moleculares generales de la prognosis del cáncer (25, 26) y de resistencia a la quimioterapia (29), así como una nueva base conceptual para el diseño de nuevas terapias anticancerosas (72, 73).

EL RENACIMIENTO DE LA MITOCONDRIA EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

En la actualidad son distintas las interpretaciones que se proponen para explicar el denominado efecto Warburg de los tumores (22, 24, 25, 74, 75). Para algunos autores el cambio al fenotipo glucolítico de los tumores es el resultado de la adaptación metabólica del tumor al ambiente hipóxico donde éste se desarrolla (24, 74). Para otros, el cambio al fenotipo glucolítico de los tumores es el resultado de mutaciones que afectan a oncogenes (*myc*) (76) y proteínas que participan en las vías de transducción de señales (Akt) (75) que, en última instancia, promueven los cambios en la expresión de los genes que gobiernan el metabolismo energético celular. Desde nuestra perspectiva, consideramos que la hipótesis que sigue siendo válida es la original que sustenta la teoría de Warburg, es decir, el cambio al fenotipo glucolítico del tumor resulta de aquellas mutaciones y/o factores epigenéticos que impactan en la función transductora de energía de la mitocondria, ya sean sobre los genes nucleares o mitocondriales directamente implicados en esta actividad o en aquellos que gobiernan la expresión de los mismos y afectan a la biogénesis de la mitocondria y el normal desarrollo de la función de transducción de energía del orgánulo en la célula (8). De hecho, como indicaba anteriormente, son varios los estudios que indican que en algunos tipos de cáncer se producen mutaciones sobre el pequeño material genético de la mitocondria (41, 42, 44, 77) o sobre genes nucleares que ejercen su función metabólica en el propio orgánulo (40, 46, 47, 78). Más aún, recientemente se ha descrito que la acumulación de succinato

por falta de actividad de la succinato deshidrogenasa en la célula tumoral (40, 46, 47) puede participar en la expresión del fenotipo glucolítico, ya que este intermediario metabólico inhibe la prolil-hidroxilasa de HIF-1 α (79). Es decir, proponemos que el cambio al fenotipo glucolítico del tumor es el resultado de un fenómeno de adaptación metabólica de la célula tumoral gobernado por la carga energética, tal y como establece el principio de regulación metabólica que conocemos como efecto Pasteur. En este sentido, es importante resaltar que recientemente hemos puesto de manifiesto como la expresión de β -F1-ATPasa por control de la traducción de su mRNA, mecanismo que controla la expresión de esta proteína en desarrollo (36, 80, 81) y en cáncer (57), depende del estado energético de la célula mediante la regulación de la actividad de unión de las proteínas que reprimen la traducción del mRNA (54). Es decir, el grado de expresión de la subunidad β -F1-ATPasa de la mitocondria puede ser considerado como un sensor del estado metabólico de la célula. Nuestra hipótesis no excluye que el fenotipo glucolítico de los tumores pueda verse exacerbado por la falta de disponibilidad de oxígeno del tumor y/o por mutaciones que impacten en oncogenes y genes de la transducción de señales que gobiernen la expresión de genes del metabolismo glucolítico. Recientemente, por una aproximación metabólica en un modelo celular de carcinogénesis, se ha propuesto que estas dos últimas hipótesis, alteración de la función transductora de energía de la mitocondria *versus* alteraciones en genes causantes del cáncer, son enteramente compatibles al estar íntimamente relacionadas (82). En cualquier caso, lo que es evidente es que el fenotipo metabólico del cáncer nos está aportando unos marcadores de gran utilidad para la prognosis y diseño de futuras pautas terapéuticas de los pacientes oncológicos que, para hacer justicia al gran bioquímico alemán O. Warburg, no podemos seguir ignorando por más años.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis colegas y colaboradores de ahora, y del pasado más reciente, las discusiones tan fructíferas que hemos mantenido sobre este tema durante los últimos años. Asimismo, agradezco su contribución entusiasta que ha permitido materializar este trabajo. El trabajo realizado en el laboratorio del autor se ha financiado con proyectos del

Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Educación, Ministerio de Sanidad y Consumo y de la Comunidad de Madrid. El Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» disfruta de una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ROJO, G.; CHAMORRO, M.; SALAS, M.L.; VINUELA, E.; CUEZVA, J.M. and SALAS, J. (1998): Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J. Virol.*, **72**, 7583-7588.
- (2) CUEZVA, J.M.; OSTRONOFF, L.K.; RICART, J.; LOPEZ DE HEREDIA, M.; DI LIEGRO, C.M. and IZQUIERDO, J.M. (1997): Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 365-77.
- (3) GARESSE, R. and VALLEJO, C.G. (2001): Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, **263**, 1-16.
- (4) FERNÁNDEZ-SILVA, P.; ENRÍQUEZ, J.A. and MONTOYA, J. (2003): Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, **88**, 41-56.
- (5) CUEZVA, J.M.; OSTRONOFF, L.K.; RICART, J.; LÓPEZ DE HEREDIA, M.; DI LIEGRO, C. M. and IZQUIERDO, J.M. (1997): Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 365-377.
- (6) MOOTHA, V.K.; BUNKENBORG, J.; OLSEN, J.V.; HJERRILD, M.; WISNIEWSKI, J.R.; STAHL, E.; BOLOURI, M.S.; RAY, H.N.; SIHAG, S.; KAMAL, M.; PATTERSON, N.; LANDER, E.S. and MANN, M. (2003): Integrated analysis of protein composition, tissue diversity and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, **115**, 629-640.
- (7) ORTEGA, A.D. and CUEZVA, J.M. (2004): The organelles I: Mitochondrial failure and neurodegeneration. In: *Brain Damage and Repair* (Herdegen, T. and Delgado-García, J. eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 95-110.
- (8) ORTEGA, A.D. and CUEZVA, J.M. (2005): Mitochondria in cancer biology. In: *New Frontiers in Mitochondrial Biogenesis and Disease* (Villarroya, F. ed.), Research Signpost, Kerala, India, pp. 111-139.
- (9) BOYER, P.D. (1997): The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717-749.
- (10) CAPALDI, R.A. and AGGELER, R. (2002): Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci*, **27**, 154-160.
- (11) GREEN, D.R. and REED, J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- (12) FERRI, K.F. and KROEMER, G. (2001): Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, E255-263.
- (13) WANG, X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.

- (14) WALLACE, D.C. (1999): Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1428.
- (15) TAYLOR, R.W. and TURNBULL, D.M. (2005): Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, **6**, 389-402.
- (16) NEMOTO, S. and FINKEL, T. (2004): Ageing and the mystery at Arles. *Nature*, **429**, 149-152.
- (17) TRIFUNOVIC, A.; WREDENBERG, A.; FALKENBERG, M.; SPELBRINK, J.N.; ROVIO, A.T.; BRUDER, C.E.; BOHLOOLY-Y, M.; GIDLOF, S.; OLDFORS, A.; WIBOM, R.; TORNELL, J.; JACOBS, H.T. and LARSSON, N.G. (2004): Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**, 417-423.
- (18) REED, J.C. (1999): Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, **11**, 68-75.
- (19) SCARPULLA, R.C. (2002): Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, **286**, 81-89.
- (20) WARBURG, O. (1930): *Metabolism of tumors*. Arnold Constable, London.
- (21) WARBURG, O. (1956): On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309-314.
- (22) GARBER, K. (2004): Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 1805-1806.
- (23) DANG, C.V. and SEMENZA, G.L. (1999): Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci*, **24**, 68-72.
- (24) SEMENZA, G.L.; ARTEMOV, D.; BEDI, A.; BHUJWALLA, Z.; CHILES, K.; FELDSER, D.; LAUGHNER, E.; RAVI, R.; SIMONS, J.; TAGHAVI, P. and ZHONG, H. (2001): «The metabolism of tumours»: 70 years later. *Novartis Found Symp*, **240**, 251-260.
- (25) CUEZVA, J.M.; KRAJEWSKA, M.; LÓPEZ DE HEREDIA, M.; KRAJEWSKI, S.; SANTAMARÍA, G.; KIM, H.; ZAPATA, J.M.; MARUSAWA, CHAMORRO, M. and REED, J.C. (2002): The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.*, **62**, 6674-6681.
- (26) CUEZVA, J.M.; CHEN, G.; ALONSO, A.M.; ISIDORO, A.; MISEK, D.E.; HANASH, S.M. and BEER, D.G. (2004): The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis*, 1157-1163.
- (27) ISIDORO, A.; MARTÍNEZ, M.; FERNÁNDEZ, P.L.; ORTEGA, A.D.; SANTAMARÍA, G.; CHAMORRO, M.; REED, J.C. and CUEZVA, J.M. (2004): Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*, **378**, 17-20.
- (28) CHEN, G.; GHARIB, T.G.; WANG, H.; HUANG, C.C.; KUICK, R.; THOMAS, D.G.; SHEDDEN, K.A.; MISEK, D.E.; TAYLOR, J.M.; GIORDANO, T.J.; KARDIA, S.L.; IAN- NETTONI, M.D.; YEE, J.; HOGG, P.J.; ORRINGER, M.B.; HANASH, S.M. and BEER, D.G. (2003): Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 13537-13542.
- (29) SHIN, Y.K.; YOO, B.C.; CHANG, H.J.; JEON, E.; HONG, S.H.; JUNG, M.S.; LIM, S.J. and PARK, J.G. (2005): Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase

- in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res*, **65**, 3162-3170.
- (30) MAYOR, F. and CUEZVA, J.M. (1985): Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol Neonate*, **48**, 185-196.
 - (31) VALCARCE, C.; NAVARRETE, R.M.; ENCABO, P.; LOECHES, E.; SATRÚSTEGUI, J. and CUEZVA, J.M. (1988): Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7767-7775.
 - (32) VALCARCE, C.; VITORICA, J.; SATRÚSTEGUI, J. and CUEZVA, J.M. (1990): Rapid postnatal developmental changes in the passive proton permeability of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J Biochem (Tokyo)*, **108**, 642-645.
 - (33) VALCARCE, C. and CUEZVA, J.M. (1991): Interaction of adenine nucleotides with the adenine nucleotide translocase regulates the developmental changes in proton conductance of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.*, **294**, 225-228.
 - (34) CUEZVA, J.M.; OSTRONOFF, L.K.; RICART, J.; LÓPEZ DE HEREDIA, M.; DI LIEGRO, C.M. and IZQUIERDO, J.M. (1997): Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29**, 365-377.
 - (35) IZQUIERDO, J.M.; LUIS, A.M. and CUEZVA, J.M. (1990): Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9090-9097. Notes: Label: 75.
 - (36) IZQUIERDO, J.M.; RICART, J.; OSTRONOFF, L.K.; EGEA, G. AND CUEZVA, J.M. (1995): Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10342-10350.
 - (37) IZQUIERDO, J.M.; JIMÉNEZ, E. and CUEZVA, J.M. (1995): Hypothyroidism affects the expression of the beta-F1-ATPase gene and limits mitochondrial proliferation in rat liver at all stages of development. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 344-350.
 - (38) HANSSON, A.; HANCE, N.; DUFOUR, E.; RANTANEN, A.; HULTENBY, K.; CLAYTON, D.A.; WIBOM, R. and LARSSON, N.G. (2004): A switch in metabolism precedes increased mitochondrial biogenesis in respiratory chain-deficient mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 3136-3141.
 - (39) PALLOTTI, F.; BARACCA, A.; HERNANDEZ-ROSA, E.; WALKER, W.F.; SOLAINI, G.; LENAZ, G.; MELZI D'ERIL, G.V.; DIMAURO, S.; SCHON, E.A. and DAVIDSON, M.M. (2004): Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J*, **384**, 287-293.
 - (40) BAYSAL, B.E.; FERRELL, R.E.; WILLETT-BROZICK, J.E.; LAWRENCE, E.C.; MYSSIOREK, D.; BOSCH, A.; VAN DER MEY, A.; TASCHNER, P.E.; RUBINSTEIN, W.S.; MYERS, E.N.; RICHARD, C.W.3.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. and DEVLIN, B. (2000): Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, **287**, 848-851.

- (41) POLYAK, K.; LI, Y.; ZHU, H.; LENGAUER, C.; WILLSON, J.K.; MARKOWITZ, S.D.; TRUSH, M.A.; KINZLER, K.W. and VOGELSTEIN, B. (1998): Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat. Genet.*, **20**, 291-293.
- (42) CAREW, J.S. and HUANG, P. (2002): Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer*, **1**, 9.
- (43) PARRELLA, P.; XIAO, Y.; FLISS, M.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; MAZZARELLI, P.; RINALDI, M.; NICOL, T.; GABRIELSON, E.; CUOMO, C.; COHEN, D.; PANDIT, S.; SPENCER, M.; RABITTI, C.; FAZIO, V.M. and SIDRANSKY, D. (2001): Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res*, **61**, 7623-7626.
- (44) TAN, D.J.; BAI, R.K. and WONG, L.J. (2002): Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res*, **62**, 972-976.
- (45) MODICA-NAPOLITANO, J.S. and SINGH, K. (2002): Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. *Expert Rev Mol Med*, 1-19.
- (46) HABANO, W.; SUGAI, T.; NAKAMURA, S.; UESUGI, N.; HIGUCHI, T.; TERASHIMA, M. and HORIUCHI, S. (2003): Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep*, **10**, 1375-1380.
- (47) NEUMANN, H.P.; PAWLU, C.; PECZKOWSKA, M.; BAUSCH, B.; McWHINNEY, S.R.; MURESAN, M.; BUCHTA, M.; FRANKE, G.; KLISCH, J.; BLEY, T.A.; HOEGERLE, S.; BOEDEKER, C.C.; OPOCHER, G.; SCHIPPER, J.; JANUSZEWICZ, A. and ENG, C. (2004): Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA*, **292**, 943-951.
- (48) MORAIS, R.; ZINKEWICH-PEOTTI, K.; PARENT, M.; WANG, H.; BABAI, F. and ZOLLINGER, M. (1994): Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. *Cancer Res*, **54**, 3889-3896.
- (49) CAVALLI, L.R.; VARELLA GARCIA, M. and LIANG, B.C. (1997): Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell. Growth Differ.*, **8**, 1189-1198.
- (50) PETROS, J.A.; BAUMANN, A.K.; RUIZ-PESINI, E.; AMIN, M.B.; SUN, C.Q.; HALL, J.; LIM, S.; ISSA, M.M.; FLANDERS, W.D.; HOSSEINI, S.H.; MARSHALL, F.F. and WALLACE, D.C. (2005): mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 719-724.
- (51) SHIDARA, Y.; YAMAGATA, K.; KANAMORI, T.; NAKANO, K.; KWONG, J.Q.; MANFREDI, G.; ODA, H.; and OHTA, S. (2005): Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res*, **65**, 1655-1663.
- (52) AMUTHAN, G.; BISWAS, G.; ZHANG, S.Y.; KLEIN-SZANTO, A.; VIJAYASARATHY, C. and AVADHANI, N.G. (2001): Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J*, **20**, 1910-1920.
- (53) AMUTHAN, G.; BISWAS, G.; ANANADATHEERTHAVARADA, H.K.; VIJAYASARATHY, C.; SHEPHARD, H.M. and AVADHANI, N.G. (2002): Mitochondrial stress-induced

- calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene*, **21**, 7839-7849.
- (54) IZQUIERDO, J.M. and CUEZVA, J.M. (2005): Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys*, **433**, 481-486.
- (55) SAN MARTÍN, C.; FLORES, A.I. and CUEZVA, J.M. (1995): Cpn60 is exclusively localized into mitochondria of rat liver and embryonic Drosophila cells. *J. Cell. Biochem.*, **59**, 235-245.
- (56) CUEZVA, J.M.; FLORES, A.I.; LIRAS, A.; SANTAREN, J.F. and ALCONADA, A. (1993): Molecular chaperones and the biogenesis of mitochondria and peroxisomes. *Biol Cell*, **77**, 47-62.
- (57) LÓPEZ DE HEREDIA, M.; IZQUIERDO, J.M. and CUEZVA, J.M. (2000): A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem*, **275**, 7430-7437.
- (58) UNWIN, R.D.; CRAVEN, R.A.; HARNDEN, P.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N.; KNOWLES, M.; EARDLEY, I.; SELBY, P.J. and BANKS, R.E. (2003): Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*, **3**, 1620-1632.
- (59) MEIERHOFER, D.; MAYR, J.A.; FOETSCHL, U.; BERGER, A.; FINK, K.; SCHMELLER, N.; HACKER, G.W.; HAUSER-KRONBERGER, C.; KOFLER, B. and SPERL, W. (2004): Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinomas. *Carcinogenesis*, **25**, 1005-1010.
- (60) YIN, P.H.; LEE, H.C.; CHAU, G.Y.; WU, Y.T.; LI, S.H.; LUI, W.Y.; WEI, Y.H.; LIU, T.Y. and CHI, C.W. (2004): Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, **90**, 2390-2396.
- (61) HERVOUET, E.; DEMONT, J.; PECINA, P.; VOJTISKOVA, A.; HOUSTEK, J.; SIMONNET, H. and GODINOT, C. (2005): A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis*, **26**, 531-539.
- (62) HE, Q.Y.; CHEN, J.; KUNG, H.F.; YUEN, A.P. and CHIU, J.F. (2004): Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, **4**, 271-278.
- (63) COSTELLO, L.C. and FRANKLIN, R.B. (2000): The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*, **59**, 269-282.
- (64) RAMASWAMY, S. and GOLUB, T.R. (2002): DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol*, **20**, 1932-1941.
- (65) RAMASWAMY, S.; ROSS, K.N.; LANDER, E.S. and GOLUB, T.R. (2003): A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, **33**, 49-54.
- (66) BEER, D.G.; KARDIA, S.L.; HUANG, C.C.; GIORDANO, T.J.; LEVIN, A.M.; MISEK, D.E.; LIN, L.; CHEN, G.; GHARIB, T.G.; THOMAS, D.G.; LIZYNESS, M.L.; KUICK,

- R.; HAYASAKA, S.; TAYLOR, J.M.; IANNETTONI, M.D.; ORRINGER, M.B. and HANASH, S. (2002): Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*, **8**, 816-824.
- (67) LIU, E.T. (2003): Classification of cancers by expression profiling. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 97-103.
- (68) CHEN, G.; GHARIB, T.G.; HUANG, C.C.; THOMAS, D.G.; SHEDDEN, K.A.; TAYLOR, J.M.; KARDIA, S.L.; MISEK, D.E.; GIORDANO, T.J.; IANNETTONI, M.D.; ORRINGER, M.B.; HANASH, S.M. and BEER, D.G. (2002): Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, **8**, 2298-2305.
- (69) PETRICOIN, E.F.; ZOOM, K.C.; KOHN, E.C.; BARRETT, J.C. and LIOTTA, L.A. (2002): Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 683-695.
- (70) WULFKUHLE, J.D.; LIOTTA, L.A. and PETRICOIN, E.F. (2003): Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 267-275.
- (71) VERMA, M.; KAGAN, J.; SIDRANSKY, D. and SRIVASTAVA, S. (2003): Proteomic analysis of cancer-cell mitochondria. *Nat Rev Cancer*, **3**, 789-795.
- (72) GESCHWIND, J.F.; KO, Y.H.; TORBENSON, M.S.; MAGEE, C. and PEDERSEN, P.L. (2002): Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res*, **62**, 3909-3913.
- (73) KO, Y.H.; SMITH, B.L.; WANG, Y.; POMPER, M.G.; RINI, D.A.; TORBENSON, M.S.; HULLIHEN, J. and PEDERSEN, P.L. (2004): Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**, 269-275.
- (74) DANG, C.V.; RESAR, L.M.; EMISON, E.; KIM, S.; LI, Q.; PRESCOTT, J.E.; WONSEY, D. and ZELLER, K. (1999): Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res*, **253**, 63-77.
- (75) ELSTROM, R.L.; BAUER, D.E.; BUZZAI, M.; KARNAUSKAS, R.; HARRIS, M.H.; PLAS, D.R.; ZHUANG, H.; CINALLI, R.M.; ALAVI, A.; RUDIN, C.M. and THOMPSON, C.B. (2004): Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 3892-3899.
- (76) OSTHUS, R.C.; SHIM, H.; KIM, S.; LI, Q.; REDDY, R.; MUKHERJEE, M.; XU, Y.; WONSEY, D.; LEE, L.A. and DANG, C.V. (2000): Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem*, **275**, 21797-21800.
- (77) FLISS, M.S.; USADEL, H.; CABALLERO, O.L.; WU, L.; BUTA, M.R.; ELEFF, S.M.; JEN, J. and SIDRANSKY, D. (2000): Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, **287**, 2017-2019.
- (78) ENG, C.; KIURU, M.; FERNÁNDEZ, M.J. and AALTONEN, L.A. (2003): A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer*, **3**, 193-202.
- (79) SELAK, M.A.; ARMOUR, S.M.; MACKENZIE, E.D.; BOULAHBEL, H.; WATSON, D.G.; MANSFIELD, K.D.; PAN, Y.; SIMON, M.C.; THOMPSON, C.B. and GOTTLIEB, E.

- (2005): Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, **7**, 77-85.
- (80) LUIS, A.M.; IZQUIERDO, J.M.; OSTRONOFF, L.K.; SALINAS, M.; SANTARÉN, J.F. and CUEZVA, J.M. (1993): Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1868-1875.
- (81) IZQUIERDO, J.M. and CUEZVA, J.M. (1997): Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5255-5268.
- (82) RAMANATHAN, A.; WANG, C. and SCHREIBER, S.L. (2005): Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 5992-5997.